

## بررسی اثر نوروتروفیک Silibinin بر تمایز سلول‌های بنیادی فولیکول مو به نورون

سارا آسال گو<sup>۱</sup>، ملیحه نوبخت<sup>۲</sup>، ناهید رهبر روشندل<sup>۳</sup>، کاظم موسوی زاده<sup>۴</sup>، نوروز نجف‌زاده<sup>۵</sup>، بهاره کردستانی شرق<sup>۶</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

<sup>۲</sup> دانشیار بافت‌شناسی، مرکز تحقیقات سلولی - ملکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

<sup>۳</sup> دانشیار فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

<sup>۴</sup> دانشجوی دکتری علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

<sup>۵</sup> کارشناس ارشد بافت‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** ناحیه‌ی Bulge فولیکول مو به دلیل دسترسی آسان به سلول‌های بنیادی چند استعدادی (Multipotent) اهمیت ویژه‌ای دارد، و بیان‌کننده‌ی مارکر نستین (پروتئین مربوط به سلول‌های بنیادی عصبی) می‌باشد. سلول‌های بنیادی در این ناحیه با قدرت و توانایی بالا قادر به تمایز به انواعی از سلول‌های عصبی هستند. Silibinin نیز به عنوان ماده‌ی مؤثره‌ی گیاه خار مریم (Silybummarinum) دارای خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، نوروتروفیکی و حفاظت‌کننده‌ی سلول‌های عصبی است. هدف از این مطالعه، بررسی افزایش تعداد سلول‌های نورونی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی فولیکول مو در اثر مجاورت با Silibinin می‌باشد.

**روش بررسی:** ابتدا ناحیه‌ی Bulge فولیکول موی سیل (Vibrissa) موش صحرایی به وسیله‌ی پنس جراحی جدا گردید و سپس سلول‌های جدا شده به مدت یک هفته در مجاورت محیط DMEM/F12 و فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) کشت داده شدند. در ادامه سلول‌ها را در پلیت‌های محتوی فاکتورهای نوروتروفین (Neurotrophin-3) و Silibinin با غلظت‌های (۰/۵، ۰/۱، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲ هفته قرار داده، و مقایسه آن‌ها با یکدیگر صورت گرفت. سلول‌های پیش‌ساز عصبی در ناحیه‌ی Bulge و سلول‌های بنیادی تمایز یافته به نورون‌ها به ترتیب با استفاده از آنتی‌بادی نستین (Nestin) و آنتی‌بادی بتا تری توبولین ( $\beta$  III Tubulin) با تکنیک ایمونوسیتوشیمی بررسی شدند، مقایسه‌ی یافته‌ها با استفاده از آزمون تی انجام گردید، و  $P < ۰/۰۵$  سطح معنی‌دار اختلاف‌ها تلقی شد.

**یافته‌ها:** در این پژوهش مارکر نستین در ناحیه‌ی Bulge طی هفته‌ی اول به وضوح بیان شد، و پس از مدت ۲ هفته هم‌زمان با روند تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی نورون، بیان آنتی‌بادی بتا تری توبولین در سلول‌های عصبی مشاهده گردید. Silibinin در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی سلول‌های بنیادی کاملاً اثر سمی داشت و رشد سلول‌ها را در همان هفته‌ی اول متوقف نمود. حداکثر تمایز در غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به طور معنی‌دار مشاهده گردید ( $P < ۰/۰۵$ ). اثرات افزایش در روند تمایز با افزایش مقدار Silibinin کاهش یافت. در غلظت‌های مختلف Silibinin همراه نوروتروفین ۳ (NT3)، افزایش روند تمایز در سلول‌های بنیادی دیده شد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به یافته‌های این تحقیق، Silibinin در غلظت‌های ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بالاتر از آن اثری کاملاً سمی بر روند رشد و تمایز سلول‌های بنیادی فولیکول دارد، و در غلظت‌های کمتر از ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر، اثر معنی‌داری در تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی ایجاد نمی‌کند، در صورتی که Silibinin در غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌تواند اثر معنی‌داری بر روند تمایز سلول‌های بنیادی فولیکول مو به نورون‌ها داشته باشد، که نشان‌دهنده‌ی نقش نوروتروفیک این دارو است.

**کلید واژه‌ها:** نستین؛ بتا تری توبولین؛ سیلی بینین؛ فولیکول مو.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی: manob@iums.ac.ir

تلفن: ۸۸۰۵۸۶۸۹-۰۲۱

تاریخ پذیرش: ۸۸/۸/۱۹

تاریخ دریافت: ۸۸/۴/۲۲

## مقدمه

یکی از سیستم‌های مهم ارتباطی بدن موجود زنده سیستم عصبی می‌باشد که نورون‌ها به عنوان سلول‌های تخصص‌یافته‌ی این دستگاه با دریافت تحریکات، موجب فعالیت حرکتی یا ترشحی در سایر سلول‌ها می‌گردند. با توجه به اهمیت نورون‌ها، در صورت تخریب و دژنراسیون، می‌توان از سایر سلول‌ها برای جایگزینی استفاده نمود. در این ارتباط سلول‌های بنیادی منبع مناسبی برای تمایز به سلول‌های عصبی نورونی محسوب می‌شوند. در حقیقت سلول‌های بنیادی به آن دسته از سلول‌ها در بدن اطلاق می‌گردد که هنوز تمایز نیافته و انجام کار ویژه‌ای را به عهده ندارند. این سلول‌ها خاصیت خود تکثیری داشته و دارای قابلیت تمایز و تبدیل به انواع دیگر سلول‌های بدن هستند. ناحیه‌ی Bulge فولیکول مو حاوی سلول‌های چند ظرفیتی (۱) با قدرت تکثیر بالا می‌باشد (۳،۲). این سلول‌ها با منشأ سلول‌های ستیغ عصبی (Neural Crest) (۴)، به علت دارا بودن خاصیت پر استعدادی (Pluripotent) و قابلیت دسترسی آسان (۲، ۳، ۵، ۶) در محیط In Vitro جهت تهیه‌ی نورون‌ها به کار می‌روند. در سال ۲۰۰۴ طی بررسی بر روی سلول‌های ستیغ عصبی فولیکول موی بالغ (۸) در محیط In Vitro توانستند از ناحیه‌ی Bulge فولیکول مو در طی ۲ هفته به سلول‌های نورونی، سلول‌های عضلات صاف، سلول‌های شوان سل و ملانوسیت دست یابند. با توجه به قدرت و توانایی بالای سلول‌های تمایز یافته، در سال ۲۰۰۵ شوان این سلول‌ها از سلول‌های بنیادی فولیکول‌های مو در ترمیم ضایعات اعصاب سطحی نظیر اعصاب سیاتیک مورد استفاده قرار گرفت (۹). گیاه دارویی خار مریم با نام علمی Silybum Marianum و نام Milk Thistle گیاهی دو ساله بدون کرک، دارای ریشه‌ی ضخیم و با ساقه‌های ایستاده به ارتفاع ۸۰ الی ۱۵۰ سانتی‌متر می‌باشد. گل آن صورتی ارغوانی، مژک‌دار و خاردار است. این گیاه در اغلب مناطق معتدل و گرمسیر نیمکره شمالی می‌روید. عصاره‌ی دانه‌ی خشک این گیاه دارای ۱ الی ۴٪ سیلی مارین (Silymarin) بوده که شامل فلاونوئیدها از جمله سیلی بی‌نین A و B، سیلی دیانین، سیلی کریستین، دی هیدرو سیلی‌بین است (۱۴). از اثرات دارویی مهم این گیاه می‌توان به نقش عصاره‌ی اصلی این گیاه به نام (Silymarin) اشاره نمود که دارای ویژگی‌های خاصی از جمله کنترل سطح بیلی‌روبین، آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و اسپارات آمینو ترانسفراز (AST) در حد طبیعی در معتادان به الکل مبتلا به سیروز الکلی، می‌باشد (۷، ۸). Silymarin

در مبتلایان به هپاتیت نیز در کاهش طول درمان نقش به سزایی دارد (۹،۷). هم‌چنین با خاصیت برداشت رادیکال‌های آزاد، باعث پایداری غشای سلولی شده، و با مهار پراکسیداسیون لیپیدی از ایجاد دیابت، آسیب‌های ناشی از عوامل اکسیداتیو در غشای سلول‌های کبدی، میکروزوم‌ها و میتوکندری جلوگیری می‌کند. Silymarin هم‌چنین باعث مهار ستر DNA و رشد سلول‌های سرطانی در نمونه‌های کشت سلولی پروستات، پستان و رحم می‌گردد (۱۰)، و اثرات این گیاه بیشتر از طریق برداشت رادیکال‌های آزاد و تقویت سیستم ایمنی اعمال می‌شود. از دیگر تأثیرات مهم این عصاره می‌توان به خاصیت نوروتروفیک آن بر روی سلول‌های PC12 اشاره نمود که باعث رشد طول اکسون‌های سلول‌های عصبی در این دسته از سلول‌ها می‌شود (۱۱). در سال ۲۰۰۴ طی پژوهشی بر روی ماده‌ی مؤثره‌ی Silibinin و سلول‌های HL60 محققین توانستند این دسته از سلول‌ها را با استفاده از این ماده به سلول‌های مونوسیت بالغ تمایز دهند و این به دلیل خصوصیت تمایز (Differentiation) ماده‌ی Silibinin در این دسته از سلول‌ها بود (۱۲). با توجه به این که Silibinin جزء ترکیبات اصلی Silymarin مطرح است، لذا در این مطالعه با ارزیابی خواص نوروتروفیک این گیاه با استفاده از Silibinin اثرات نوروتروفیک آن بر روی سلول‌های بنیادی ناحیه‌ی Bulge فولیکول مو بررسی گردید.

## روش بررسی

**جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی:** این مطالعه بر روی موش صحرایی Wistar ماده با وزن تقریبی ۲۰۰-۱۵۰ گرم انجام شد. این حیوانات از انستیتو پاستور خریداری و در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. از فولیکول‌های اطراف گونه‌های موش جهت تهیه‌ی سلول‌های بنیادی به روش Kobayashi، Amoh استفاده گردید (۱۲). حیوان به وسیله کتامین و گزایلزین بیهوش و اطراف گونه‌ها با بتادین ضدعفونی و تراشیده شد. نمونه‌ها در الکل ۷۰٪ و PBS شستشو و به قطعات کوچک (۴×۱۰) تقسیم شدند. جهت جداسازی پوست اطراف فولیکول‌ها، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در محلول کلاژناز (۳٪) و دیسپاز II (۵٪) در دمای ۳۷ درجه به مدت یک ربع انکوبه گردیدند، و سپس در داخل محیط DMEM/F12، محتوی پنی‌سیلین ۱۰۰ un/ml، استرپتومایسین ۱۰۰ مول بر میلی‌لیتر،

آمفو ترپسین B به مدت ۳۰ دقیقه مجدداً انکوبه شدند. ناحیه‌ی Bulge در دو سوم فوقانی فولیکول مو با استفاده از یک سوزن کوچک و با دو برش عرضی از ناحیه فوقانی و تحتانی مو جدا شده و در ادامه به مدت نیم ساعت در ترپسین (۱۲۵٪) و EDTA (Ethylenediamine Tetracetic Acide) (۰/۰۱٪) در دمای ۳۷ انکوبه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه با دور (۱۲۰۰ rpm) سانتریفوژ شد.

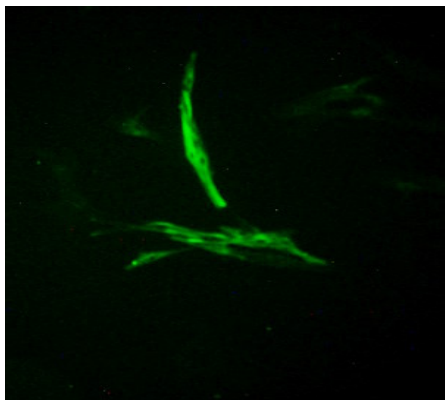
**کشت ناحیه‌ی Bulge:** پس از انجام سانتریفوژ، سلول‌ها بر روی پلیت‌های شش خانه که به صورت Cover Slip با کلاژن نوع یک کد شده و محتوی محیط (DMEM/F12 (3/1) و (5% FBS و هیدروکورتیزون ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر و EGF 10mg/ml (Epidermal Growth Factor) (Sigma-Aldrich) و کلروتوکسین ۱۰ M (Aldrich- Sigma)، گلو تامین ۴/۳ Mm و ۵ میکروگرم انسولین بودند، کشت داده شدند. در ادامه سلول‌ها را در داخل انکوباتور و دمای ۳۷ درجه و ۵٪ CO<sub>2</sub> گذاشته و در هر دو روز محیط آن‌ها تعویض گردید. پس از انجام اولین پاساژ در روز هفتم و با خارج کردن EGF از محیط، سلول‌ها در مجاورت فاکتور NT3 (Neurotrophin) ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر و Silibinin با غلظت‌های (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۷، ۱ میکروگرم بر میلی لیتر) و NT3 و Silibinin با غلظت‌های بالا به مدت ۲ هفته قرار گرفتند. سپس سلول‌ها را در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه و ۵٪ CO<sub>2</sub> گذاشته و هر دو روز یکبار محیط آن‌ها تعویض گردید. سپس با تکنیک ایمونوسیتوشیمی سلول‌ها بررسی شدند.

رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی با استفاده از آنتی بادی Nestin جهت بررسی (Nestin Positive) مثبت بودن ناحیه Bulge فولیکول مو به آنتی بادی Nestin، پس از طی یک هفته صورت گرفت. ابتدا محیط روی سلول‌ها را برداشته و رنگ آمیزی طبق مراحل زیر انجام گردید: پارافرمالدید (۰/۴٪)؛ یک ساعت، ۳ بار شستشو با PBS (pH=7.4)، استفاده از تریتون (۰/۲٪)؛ به مدت ۲۰ دقیقه، ۳ بار شستشو با PBS، استفاده از Normal Goat Serum (۰/۲٪)؛ به مدت یک ساعت، استفاده از آنتی بادی Nestin؛ نسبت (۱:۲۰۰)؛ به مدت یک ساعت، ۳ بار شستشو با PBS به مدت ۲۰ دقیقه، آنتی بادی ثانویه FITC؛ به نسبت (۱:۱۰۰)؛ به مدت ۲ ساعت، ۳ بار شستشو با PBS به مدت ۲۰ دقیقه، بعد از رنگ آمیزی با قرار دادن گلیسرول روی لام، بررسی سلول‌های عصبی تمایز یافته صورت گرفت. در ادامه مجدداً محیط روی سلول‌ها

برداشته و رنگ آمیزی طبق مراحل زیر انجام شد: پارافرمالدید (۰/۴٪)؛ یک ساعت، ۳ بار شستشو با PBS (۰/۱٪)؛ ۱۵ دقیقه، استفاده از تریتون (۰/۱٪)؛ به مدت ۲۰ دقیقه، ۳ بار شستشو با PBS به مدت ۲۰ دقیقه، Normal Goat Serum (۰/۲٪)؛ به مدت یک ساعت، آنتی بادی اولیه  $\beta$  III Tubulin (۱:۲۰۰)؛ ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه، در تاریکی و رطوبت، ۲ ساعت در دمای اتاق، شستشو با PBS به مدت ۲۰ دقیقه، آنتی بادی ثانویه FITC (۱:۲۰۰)؛ به مدت ۲ ساعت، شستشو با PBS به مدت ۲۵ دقیقه، رنگ آمیزی با DAPI به نسبت (۱:۱۰۰۰)؛ به مدت ۱۵ دقیقه، شستشو با PBS به مدت ۲۰ دقیقه، پس از رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی با قراردادن گلیسرول روی لام با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت سلول‌ها شمارش گردید، و سپس سلول‌ها با آزمون تی تجزیه و تحلیل شدند.

## یافته‌ها

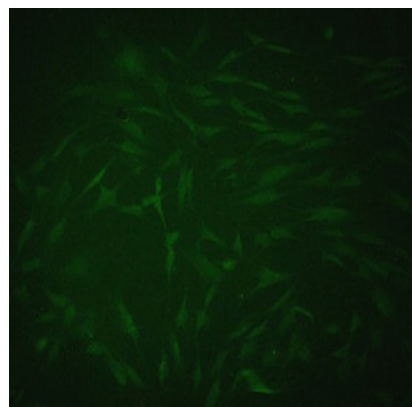
در این مطالعه رشد سلول‌های بنیادی فولیکول مو در محیط In Vitro با استفاده از فاکتور EGF و کلروتوکسین صورت گرفت. مارکر Nestin سلول‌های پیش ساز نورونی در ناحیه Bulge یک هفته پس از کشت سلول‌های بنیادی با استفاده از آنتی بادی اولیه Nestin و آنتی بادی ثانویه کونژوکه FITC با روش ایمونوسیتوشیمی نشان‌دار شده و سپس با میکروسکوپ ایمونوفلورسانس، واکنش شدید سیتوپلاسم سلول‌های بنیادی پیش ساز عصبی به آنتی بادی Nestin مشاهده شد (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱: کشت سلول‌های بنیادی ناحیه Bulge فولیکول موی سیل موش صحرایی و بیان مارکر Nestin یک هفته پس از کشت سلول‌ها

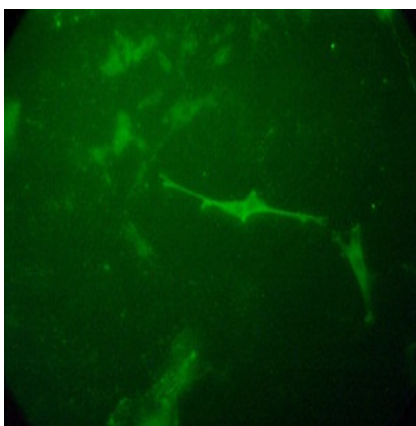
پس از طی ۲ هفته از روند کشت سلول‌ها، سلول‌های پیش ساز عصبی در ناحیه‌ی Bulge فولیکول مو به انواعی از سلول‌های عصبی و

غیرعصبی تمایز یافتند. هنگامی که این سلول‌ها با آنتی‌بادی اولیه Nestin و آنتی‌بادی ثانویه کونژوکه FITC مجاور شدند، هیچ‌یک از این سلول‌ها با مارکر Nestin واکنش نشان ندادند (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲: سلول‌های تمایز یافته و عدم بیان مارکر Nestin در سلول‌ها پس از گذشت ۲ هفته از پاساژ بزرگنمایی ۲۰۰

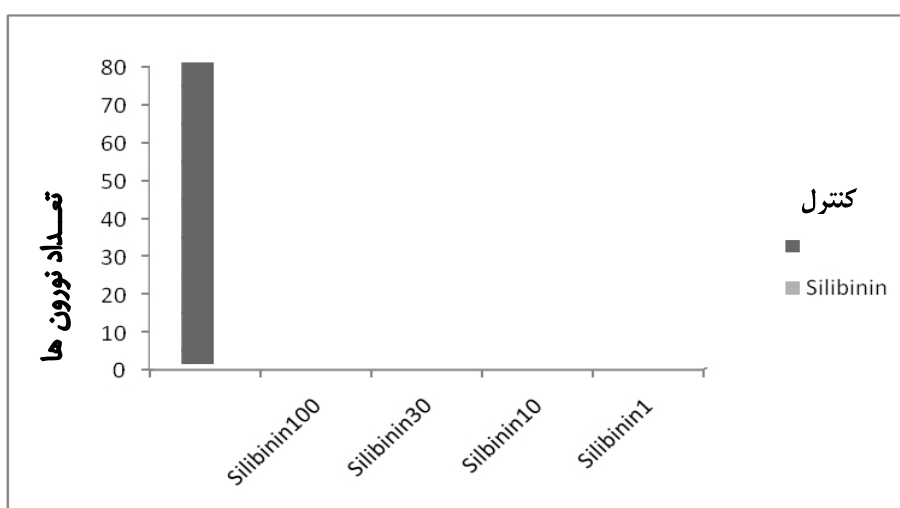
پس از ۲ هفته از کشت سلول‌های بنیادی، سلول‌های تمایز یافته‌ی نورونی با استفاده از آنتی‌بادی اولیه  $\beta$  III Tubulin و آنتی‌بادی ثانویه کونژوکه FITC با روش ایمنوسیتوشیمی نشان‌دار شده و با میکروسکوپ ایمنوفلورسانس واکنش شدید سیتوپلاسم سلول‌های تمایز یافته‌ی نورونی به آنتی‌بادی  $\beta$  III Tubulin مشاهده گردید (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳: سلول‌های بنیادی فولیکول موی کشت داده شده.

سلول نورونی تمایز یافته با رنگ آمیزی  $\beta$  III Tubulin

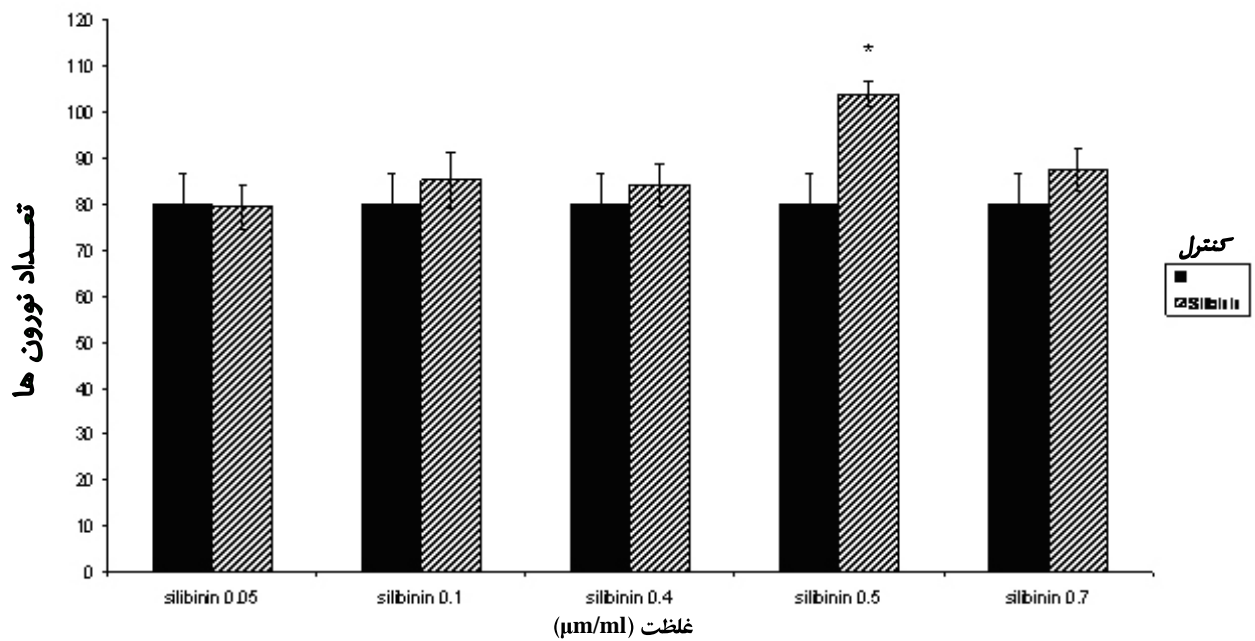
جهت افزایش توانایی تمایز سلول‌های بنیادی فولیکول موی سلول‌های نورونی، فاکتورهای نظیر NT3 و Silibinin (در غلظت‌های مختلف) به کار برده شد. در مدت ۲ هفته پس از استفاده از این فاکتورها در گروه‌های محتوی NT3 و Silibinin و مقایسه‌ی آن‌ها با گروه کنترل محتوی فاکتور EGF و کلروتوکسین، نتایج مهمی به دست آمد. شمارش سلول‌های تمایز یافته پس از استفاده از فاکتور Silibinin در مقایسه با گروه کنترل، تأثیر معنی‌داری را در روند تمایز سلول‌های بنیادی نشان داد؛ به طوری که Silibinin در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به بالا بر روی سلول‌های بنیادی کاملاً سمی بوده و رشد سلول‌ها را در همان هفته‌ی اول متوقف نمود (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱: مقایسه‌ی گروه کنترل با گروه‌های محتوی غلظت‌های بالای Silibinin 1μg/ml

با توجه به نتایج حاصله از مقادیر بالای این دارو، مقادیر کمتر از ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز بررسی شد. با شمارش سلول‌های تمایز یافته پس از استفاده از غلظت‌های مختلف Silibinin (۰/۵، ۰/۱، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در مقایسه با گروه کنترل نتایج زیر مشاهده گردید. با در نظر گرفتن مقادیر مورد

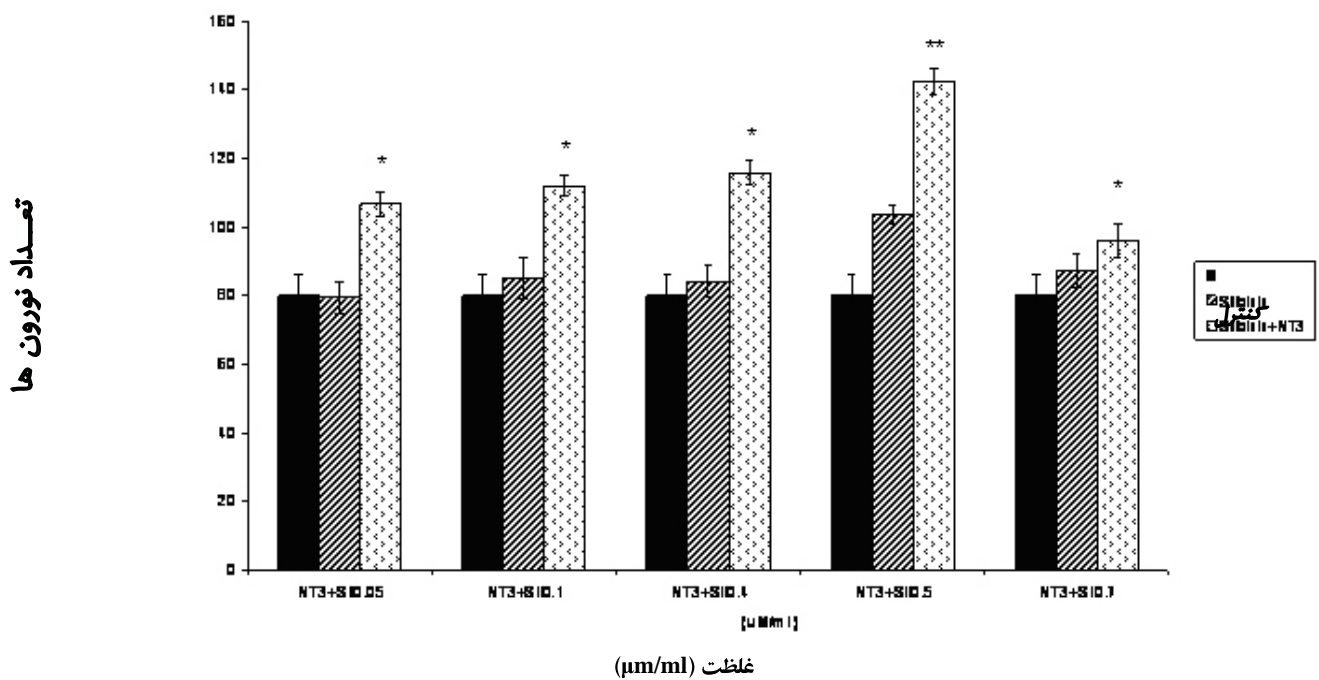
آزمایش Silibinin، به تدریج از غلظت ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر، افزایش در روند تمایز سلول‌ها، به دست آمد و حداکثر تمایز در غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به طور معنی‌داری دیده شد ( $P < 0.05$ ). اثرات افزایش در روند تمایز با افزایش مقدار Silibinin، نیز کاهش یافت (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: مقایسه‌ی گروه کنترل با گروه‌های محتوی غلظت‌های متفاوت Silibinin ( $P < 0.05$ )

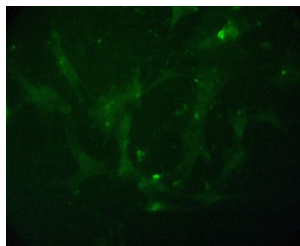
۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به طور معنی‌داری مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ) (نمودار شماره ۳).

در بررسی تأثیر توأم Silibinin و NT<sub>3</sub>، بر افزایش روند تمایز سلول‌های بنیادی با غلظت‌های مختلف، حداکثر تأثیر در غلظت

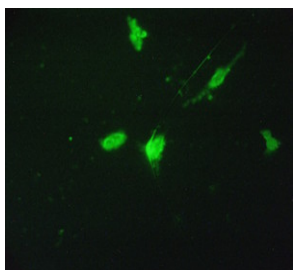


نمودار شماره ۳: مقایسه‌ی گروه کنترل با گروه‌های محتوی غلظت‌های متفاوت Silibinin همراه با NT<sub>3</sub> ( $P < 0.05$ )

استفاده شد که در سلول‌های فیروبلاست هیچ نوع واکنشی به این آنتی‌بادی مشاهده نگردید (شکل شماره ۶)، و در سلول‌های PC12 واکنش مثبت بود (شکل شماره ۷).



شکل شماره ۶: سلول فیروبلاست با رنگ‌آمیزی  $\beta$ III Tubulin به عنوان کنترل منفی.

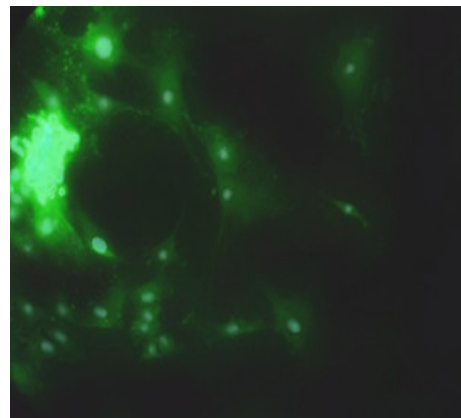


شکل شماره ۷: سلول PC12 با رنگ‌آمیزی  $\beta$ III Tubulin به عنوان کنترل مثبت.

## بحث

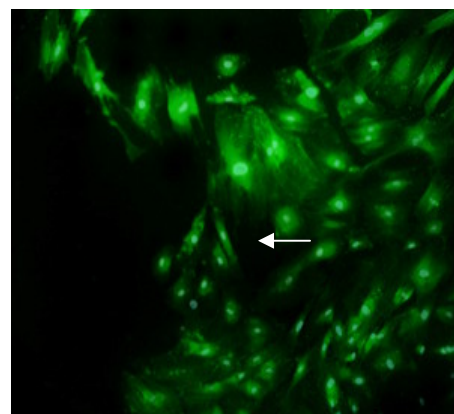
در این پژوهش سلول‌های بنیادی فولیکول مو جهت دستیابی آسان و قابلیت تمایز به سلول‌های عصبی، به عنوان منبع مناسب انتخاب و بررسی شدند. بیان واضح و مشخص مارکر Nestin در ناحیه‌ی Bulge فولیکول مو، نشان‌دهنده‌ی قدرت تمایز این دسته از سلول‌ها به انواعی از سلول‌های عصبی بود. Nestin به عنوان پروتئین فیلامان حد واسط (Intermediate Filament Protein) در سلول‌های در حال تقسیم در زمان رشد و CNS، PNS، ماهیچه‌ها و دیگر بافت‌های بدن، در طی دوره‌ی نورونیزاسیون و گلیوژنیزاسیون، جایگزین فیلامان‌های حدواسط ویژه‌ی سلول‌های نورونی به نام نوروفیلامان و پروتئین‌های گلیال به نام پروتئین‌های فیلامان فیبریلی اسیدی (GFAP) می‌شود (۶). در پژوهش حاضر، نتایج حاصل از بیان پروتئین Nestin بر روی سلول‌های بنیادی مستقر در ناحیه‌ی Bulge فولیکول‌های مو، در هفته‌ی اول کشت سلول‌ها، با استفاده از آنتی‌بادی Nestin و تکنیک

در نهایت، افزایش تعداد سلول‌های تمایز یافته به سلول‌های نورونی در غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر Silibinin به طور معنی‌داری وجود داشت (شکل شماره ۴).



شکل شماره ۴: سلول‌های بنیادی فولیکول موی کشت داده شده. سلول نورونی تمایز یافته با رنگ‌آمیزی  $\beta$ III Tubulin و DAPI (رنگ هسته سلول‌ها) در گروه محتوی Silibinin 0.5  $\mu$ g/ml

هم‌چنین در گروه ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر Silibinin محتوی NT3 در مقایسه با گروه کنترل، حداکثر تمایز نسبت به دیگر غلظت‌های این دارو مشاهده شد (شکل شماره ۵).



شکل شماره ۵: سلول نورونی تمایز یافته با رنگ‌آمیزی  $\beta$ III Tubulin و DAPI (رنگ هسته سلول‌ها) در گروه محتوی Silibinin 0.5  $\mu$ g/ml و NT3

در مطالعه‌ی حاضر، با توجه به استفاده از آنتی‌بادی  $\beta$  III Tubulin برای اثبات حضور سلول‌های نورونی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی فولیکول مو، جهت تأیید یافته‌ها و اختصاصی عمل کردن آنتی‌بادی مورد نظر، از سلول‌های فیروبلاست به عنوان کنترل منفی و از سلول‌های PC12 به عنوان کنترل مثبت،

ایمونوسیتوشیمی نشان داده شد و به علت بیان این پروتئین، در هفته‌ی اول کشت و قبل از شروع روند تمایز، حضور سلول‌های بنیادی پیش‌ساز عصبی در ناحیه‌ی Bulge تأیید گردید. در هفته‌ی دوم از کشت، با شروع روند تمایز، بیان مارکر Nestin در سلول‌های بنیادی پایان یافت، به طوری که در رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی اثری از بیان این مارکر مشاهده نگردید (۶،۳). در صورتی که معمولاً پس از طی یک هفته و با شروع روند تمایز در سلول‌های بنیادی فولیکول مو، بیان مارکرهای اختصاصی را می‌توان به وضوح مشاهده نمود. در این مطالعه جهت بررسی و تحقیق بر روی سلول‌های عصبی نورونی، از مارکر اختصاصی این دسته سلول‌ها یعنی  $\beta$  III Tubulin استفاده گردید. B III Tubulin یکی از زیر واحدهای توبولین (Tubulin) می‌باشد. Tubulin نیز یکی از پروتئین‌های مهم در فعالیت‌های میتوزی و تقسیم سلولی است که شامل دو زیر واحد  $\alpha$  و  $\beta$  بوده و هر زیر واحد دارای چندین ایزومر می‌باشد. توزیع و بیان ایزومرهای  $\beta$  نیز از بافتی به بافت دیگر متفاوت است، به طوری که بیان ایزومرهای  $\beta$  IV (NT3) و  $\beta$  III (PC12) در تمام بافت‌ها صورت می‌گیرد؛ ولی ایزومر  $\beta$  III فقط در ساختار سلول‌های نورونی و سلول‌های سرطانی بیان می‌شود (۱۶). در پژوهش حاضر، با توجه به استفاده از آنتی‌بادی  $\beta$  III Tubulin برای اثبات حضور سلول‌های نورونی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی فولیکول مو و جهت تأیید یافته‌ها و اختصاصی عمل کردن آنتی‌بادی مورد نظر، از سلول‌های فیروبلاست به عنوان کنترل منفی و از سلول‌های PC12 به عنوان کنترل مثبت، استفاده گردید که در سلول‌های فیروبلاست هیچ نوع واکنشی به این آنتی‌بادی مشاهده نشد و در سلول‌های PC12 واکنش مثبت بود. PC12 جزء سلول‌های سرطانی می‌باشد و از بخش مدولای کلیه منشأ گرفته و خاصیت نورواندوکرینی دارد، و در پاسخ به آنتی‌بادی اختصاصی  $\beta$  III Tubulin کاملاً واکنش مثبت از خود نشان می‌دهد. که این امر مشخص‌کننده‌ی واکنش کاملاً اختصاصی بوده و صحت نتایج حاصله را تأیید می‌نماید. در این مطالعه می‌توان جهت افزایش تمایز سلول‌های بنیادی فولیکول مو به سلول‌های نورونی، از فاکتور محرک رشد و تمایز سلول‌های پیش‌ساز نورونی مانند NT3 در محیط In Vitro استفاده کرد (۱۳). در هفته‌ی دوم از رشد سلول‌های پیش‌ساز عصبی، به مدت

۲ هفته و هر ۲ روز یک‌بار NT3 به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد. ارزیابی عملکرد این فاکتور در تمایز، در مقایسه با نمونه‌ی کنترل کاملاً مشهود بود، به گونه‌ای که روند تمایز سلول‌های پیش‌ساز عصبی به سلول‌های نورونی به طور معنی‌داری افزایش یافت. در این تحقیق جهت دستیابی به فاکتورهای مشابه NT3 به بررسی بر روی گیاهان دارویی از جمله گیاه دارویی خار مریم نیز پرداخته شد. با توجه به خصوصیات نوروتروفیکی و حفاظت‌کنندگی عصبی عصاره‌ی تام گیاه خار مریم (Silymarin) بر روی سلول‌های عصبی تمایز یافته از سلول‌های PC12، می‌توان به مطالعه‌ی Smita در سال ۲۰۰۲ اشاره نمود (۱۱). بررسی بر روی عصاره‌ی تام این گیاه در محدوده‌ی غلظت‌های ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر صورت گرفت، و بیشترین تأثیر بر روند رشد طول اکسون‌های سلول‌های عصبی و هم‌چنین خاصیت پاک‌کنندگی رادیکال‌های آزاد جهت بقای سلول‌های عصبی، در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید. هم‌چنین در طی تحقیقات به عمل آمده در سال ۲۰۰۱ بر روی داروی Silibinin، اثرات تمایزی (Differentiation) این دارو بر روی سلول‌های سرطانی HL60 و تمایز آن‌ها به سمت سلول‌های مونوسیت در محدوده‌ی غلظت‌های ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تا ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بررسی شد (۱۵)، در این پژوهش‌ها، بیشترین تأثیر بر روند تمایزی سلول‌های سرطانی به سمت سلول‌های مونوسیت بالغ در کوتاه‌ترین زمان در غلظت ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داده شد. با توجه به نتایج به دست آمده از عصاره‌ی تام این گیاه (Silymarin) بر روی این منبع سلول سرطانی، خصوصیات نوروتروفیک این عصاره در مقادیر بالا مشاهده گردید (۱۴). از آنجایی که Silibinin از ترکیبات اصلی عصاره‌ی (Silymarin) محسوب می‌شود؛ لذا قدرت نوروتروفیک این دارو (Silibinin) به طور خالص بر روی یک منبع سلول بنیادی بررسی شد (۱۳). اطلاعات به دست آمده از مطالعات محققین در غلظت‌های متفاوت این دارو نتایج متفاوتی را نسبت به عصاره‌ی تام این گیاه نشان داد (۱۰، ۱۱)، بنابراین در این پژوهش جهت تمایز سلول‌های بنیادی فولیکول مو به سلول‌های نورونی، بررسی‌های گسترده‌ای نسبت به مقادیر مؤثر عصاره‌ی تام این گیاه انجام گرفت. با توجه به نتایج، در طی هفته‌ی اول کشت



سلول‌های بنیادی با استفاده از غلظت‌های ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بالاتر این دارو، اثرات سمی (Toxin) بر روند تقسیمات سلولی و رشد (Proliferation) در محیط کشت سلول‌های بنیادی بررسی گردید، و با در نظر گرفتن حساسیت زیاد این منبع سلول بنیادی به مقادیر بالای این دارو، بررسی در مقادیر کمتر از ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز صورت گرفت، به طوری که در غلظت ۰/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر Silibinin، افزایش تدریجی در تمایز سلول‌های بنیادی در مقایسه با مقادیر بالاتر دیده شد. هم‌چنین در غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر Silibinin، نیز افزایش معنی‌داری در تعداد سلول نوروئنی تمایز یافته از منبع سلول‌های بنیادی فولیکول مو در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید، و با بررسی در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر Silibinin و کمتر از آن نیز تغییرات قابل توجهی در تعداد سلول‌های عصبی تمایز یافته در محیط کشت نسبت به نمونه‌ی کنترل دیده نشد. با توجه به نتایج می‌توان خصوصیت نوروتروفیک داروی Silibinin را در غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی منبع سلول‌های بنیادی فولیکول مو به طور معنی‌داری مشاهده نمود. به طوری که با افزودن این مقدار غلظت به گروه محتوی NT3، درصد عملکرد تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های نوروئنی در این گروه به طور قابل توجهی نسبت به گروه کنترل آن (NT3) افزایش می‌یابد.

## نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده در طی ۳ هفته از کشت سلول‌های بنیادی فولیکول مو و روند تمایزی آن‌ها به سمت سلول‌های نوروئنی نشان می‌دهد که Silibinin در غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان یک Neurotrophicfactor بر روی سلول‌های بنیادی اثر داشته و باعث افزایش روند تمایزی آن‌ها می‌شود. لازم به ذکر است که داروی Silibinin در هیچ‌یک از غلظت‌های مورد بررسی خاصیت تکثیر سلولی (Proliferation) را ندارد، و بیان مارکر  $\beta$  III Tubulin در ناحیه‌ی سیتوپلاسم سلول‌های عصبی به دلیل حضور توبولین ایزومر Beta III می‌باشد که ویژه سیتوپلاسم سلول‌های نوروئنی است.

بنابراین پیشنهاد می‌شود تأثیر مقادیر مختلف Silibinin، بر روی سایر منابع سلول‌های بنیادی در جهت دسترسی به سلول‌های بنیادی تمایز یافته در حداقل زمان ممکن و تمایز سلول‌های بنیادی فولیکول مو به انواع سلول‌های بررسی شده، و نقش فاکتورهای مکمل در جهت نقش قوی‌تر Silibinin بر روی تمایز سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد.

## References:

1. Alonso L, Fuches E. Stem Cells in the Skin: Waste Not. Wnt Not Genes & Development 2003;17:1189-1200.
2. Sieber-Blum M, Grim M, Hu F, Szeder V. Pluripotent Neural Crest Stem Cells in the Adult Hair Follicle. Dev Dyna 2004;231:258-269.
3. Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Penman S, Robert M. Multipotent Nestin-Positive, Keratin-Negative Hair-Follicle Bulge Stem Cell Can Form Neurons. PNAS 2005;102:5530-5534.
4. Zhang Y, Xiang M, Wang Y, Yan J, Zeng Y. Bulge Cells Human Hair Follicles Segregation Cultivation and Properties. Coll & Surfaces 2006;47:50-56.
5. Hong Yu, Dong F, Suresh M, Ling Li. Isolation of a Novel Population of Multipotent Adult Stem Cells from Human Hair Follicles. Am J Pathol 2006;168:1879-1888.
6. Li L, Mignone J, Yang M, Matic M, Penman S. Nestin Expression in Hair Follicle Sheath Progenitor Cells. PANS 2003;100(17):9958-9961.
7. Der Marderosin A. The Review of Natural Product. Missouri. Fact and Comparison 2001;405-409:512-513.
8. Fredstorn S. Nitric Oxide, Oxidative Stress and Dietary Antioxidant. Nutrition 2002;18:53-537.
9. Cayuela M. Oxygen Free Radicals and Human Disease. Bichemistry 1995;779-Chang.
10. Carin R, Comoglio A, Albano E, Poli G. Lipid Peroxidation and Irreversible Damage in the Rat Hepatocyte Model Protection by the Silibinin-Phospholipids Complex IdB-1016. Biochem Pharmacol 1992;43:2111-2115.



11. Smita K, Skuntala W, Ward A. Neurotrophic and Neuroprotective Effect of Milk Thistle (*Silybum marianum*) on Neurons in Culture. *J Mol Neurosci* 2002;18:265-269.
12. Kobayashi K, Rochat A, Barrandon Y. Segregation of keratinocyte Colony-Forming Cells in the Bulge of the Rat vibrissa. *PNAS* 1993;90:7391-7395.
13. Alceme C, Tuan D, Taube P. Neurotrophin-3 is Required for the Survival- Differentiation Subsets of Developing Enteric Neurons. *The Journal of Neuroscience* 2001;21(15):5620-5636.
14. Schulz V, Hansel R, Tyler VE. *Rational Phytotherapy: A Physicians Guide to Herbal Medicine*. Berlin: Springer;1997. p. 306.
15. Kang SN, Lee MH, Kim KM, Cho D, Kim TS. Induction of Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cell Differentiation into Monocytes by Silibinin: Involvement of Protein Kinase C. *Biochem Pharmacol* 2001;1487-1495.
16. Raff E, Fackenthal J. Microtubule Architecture Specified by a Beta Tubulin Isoform. *Science* 1997;5296.70.

